
Sektion 15

Molekulare Phytomedizin / Virologie / Bakteriologie / Mykologie III

15-1 - Die genetische Diversität des Apfelwicklergranulovirus in natürlichen Isolaten und kommerziell angewandten Produkten

The genetic diversity of Cydia pomonella granulovirus in natural isolates and commercially applied products

Jiangbin Fan¹, Jörg T. Wennmann¹, Gianpiero Gueli Alletti¹, Thomas Berner², Jens Keilwagen², Johannes A. Jehle¹

¹Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Biological Control, Heinrichstraße 243, 64287 Darmstadt

²Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Biosafety in Plant Biotechnology, Erwin-Baur-Straße 27, 06484 Quedlinburg

As one of the most successful baculovirus biocontrol agents, *Cydia pomonella granulovirus* (CpGV) has been applied for control of codling moth (*Cydia pomonella* L.) and oriental fruit moth *Grapholita molesta* (Busck) in organic and integrated pome fruit production. Newly discovered CpGV isolates and commercially applied products are able to control different types of resistance recently observed in field populations of codling moth. The analysis of new CpGV isolate provides the opportunity to improve our understanding baculovirus-host interaction.

In the current project 23 isolates, including natural isolates from three continents and commercialized products as well as pure genotype bacmids, were sequenced using Illumina next generation sequencing (NSG) techniques. Raw reads were adapter trimmed and filtered with quality parameter (Phred-quality score ≥ 30 , reads length ≥ 50). For each isolate, 2,208,599 QC-passed reads were generated and assembled separately in Galaxy server of Julius Kühn-Institut using a workflow with BWA-MEM algorithm. The obtained data sets were proceeded together to call variants using MPileup in SAM Tools. Detected 762 positions harbouring single nucleotide polymorphisms (SNPs) were split into two groups: (i) 443 previously detected and specific SNP positions for genome groups A to E, (ii) 319 newly detected SNP positions and their specificity to CpGV groups designed as new genome group N. Position specificities and frequencies of these SNPs were used to distinguish the genotype composition within a given isolate. High frequency SNPs located at open reading frames (ORFs) that are responsible for DNA replication and virus structure protein. All results could be deposited in a genetic fingerprint database that facilitates identification of resistance-breaking isolate and provide novel tools for resistance management. This in-depth study of the genetic diversity of CpGV provides novel clues on the mode of mutual adaptation between baculovirus and host.

Literatur

Gebhardt, M. M., K. E. Eberle, P. Radtke, J. A. Jehle, 2014: Baculovirus resistance in codling moth is virus isolate-dependent and the consequence of a mutation in viral gene pe38. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **111**, 15711-15716.

Gueli Alletti, G., A. J. Sauer, B. Weihrach, E. Fritsch, K. Undorf-Spahn, J. T. Wennmann, Jehle, J.A., 2017. Using Next Generation Sequencing to Identify and Quantify the Genetic Composition of Resistance-Breaking Commercial Isolates of *Cydia pomonella* Granulovirus. *Viruses*. **9**, 250.

Jehle, J. A., S. Schulze-Bopp, K. Undorf-Spahn, E. Fritsch, 2017: Evidence for a second type of resistance against *Cydia pomonella* granulovirus in field populations of codling moths. *Appl Environ Microbiol*. **83**, e02330-02316.

Sauer, A. J., E. Fritsch, K. Undorf-Spahn, P. Nguyen, F. Marec, D. G. Heckel, J. A. Jehle, 2017a: Novel resistance to *Cydia pomonella granulovirus* (CpGV) in codling moth shows autosomal and dominant inheritance and confers cross-resistance to different CpGV genome groups. *PLoS One*. **12**, e0179157.

Sauer, A. J., S. Schulze-Bopp, E. Fritsch, K. Undorf-Spahn, J. A. Jehle, 2017b: A third type of resistance of codling moth against *Cydia pomonella granulovirus* (CpGV) shows a mixture of a Z-linked and autosomal inheritance pattern. *Appl Environ Microbiol*. **83**, e01036-01017.

Wennmann, J. T., P. Radtke, K. E. Eberle, G. Gueli Alletti, J. A. Jehle, 2017: Deciphering Single Nucleotide Polymorphisms and Evolutionary Trends in Isolates of the *Cydia pomonella granulovirus*. *Viruses*. **9**, 227.

15-2 - Transkriptomanalyse des Apfelwicklergranulovirus mittels RNAseq

Jörg T. Wennmann¹, Jiangbin Fan¹, Thomas Berner², Jens Keilwagen², Johannes A. Jehle¹

¹Julius Kühn-Institut, Institut für Biologischen Pflanzenschutz, Heinrichstraße 243, 64287 Darmstadt

²Julius Kühn-Institut, Institut für die Sicherheit biotechnologischer Verfahren bei Pflanzen, Erwin-Baur-Straße 27, 06484 Quedlinburg

Das Apfelwicklergranulovirus (CpGV) ist das wichtigste biologische Pflanzenschutzmittel zur Bekämpfung des Apfelwicklers im ökologischen Apfelanbau in Deutschland und Europa. Auf CpGV basierte Produkte werden schätzungsweise auf über 100.000 ha in Europa eingesetzt. Diese biologische Bekämpfungsmethode wird bedroht durch das Auftreten von bis heute drei bekannten Resistenztypen des Apfelwicklers gegenüber kommerziell angewandten CpGV Isolaten. Obwohl mittlerweile wirksame resistenzbrechende Isolate des CpGV bekannt und zugelassen sind, weiß man wenig über den eigentlichen Mechanismus der Resistenz. Im vorliegenden Projekt wurde anhand resistenter Larven und modernster molekularbiologischer Methoden ("Next Generation Sequencing") das Expressionsprofil viraler Gene von CpGV untersucht. Dabei kamen unterschiedliche Isolate des CpGV zum Einsatz, die eine vollständige (die Resistenz überwindendes Isolat = Apfelwicklerlarve verstirbt) oder unvollständige (Infektion initiiertes Isolat, welches von Wirtszelle im weiteren Verlauf blockiert wird = Apfelwicklerlarve überlebt) Infektion verursachen. Die Transkription viraler Gene wurde mittels RNAseq untersucht. Durch die Erstellung eines Expressionsprofils können neue Informationen und Einblicke in den unbekannten Infektionszyklus von CpGV in Apfelwicklerlarven gewonnen werden. Ziel ist es, neue Wege des Resistenzmanagements zu finden und neue Erkenntnisse zur Genregulation bei Baculoviren zu erhalten.

15-3 - Das Rz2 kodierte R-Protein aus *Beta vulgaris* erkennt das *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) Transportprotein (TGB1) als Elicitor in *Nicotiana benthamiana* und löst Zelltod aus

Beta vulgaris resistance protein Rz2 recognizes the *Beet necrotic yellow vein virus* RNA2 encoded movement protein TGB1 and triggers cell death

Veronika Wetzel, Mark Varrelmann

Institut für Zuckerrübenforschung, Holtenser Landstraße 77, 37079 Göttingen

Die Viruskrankheit Rizomania bedroht den Zuckerrübenanbau mit einem Ertragsverlust von bis zu 70 % und kann nur durch resistente Sorten, welche das Resistenzgen *Rz1*, *Rz2* oder eine Kombination beider tragen, kontrolliert werden. Hauptverantwortlich an der Krankheit ist das boden-bürtige *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV), Familie *Benyviridae*, welches von dem Protisten *Polomyxa betae* übertragen wird. In Folge einer Infektion tritt eine massive Wurzelbartbildung auf, sowie Nekrosen und Vergilbungen an den Blättern. BNYVV weist ein mutlipatites, einzelsträngiges, positive-orientiertes RNA Genom auf.

Neben BNYVV spielt ein weiteres Virus aus der Familie der *Benyviridae* eine Rolle in dem Krankheitskomplex der Rizomania, das *Beet soil-borne mosaic virus* (BSBMV). BSBMV tritt ausschließlich in den USA auf und zeichnet sich durch eine nur gering abweichende Genomorganisation und einer hohen Sequenzhomologie zu BNYVV aus.

In der Studie von Capistrano-Goßmann et al. (2017) wurde *Rz2* als ein klassisches R-Gen in einer *Beta maritima* Population identifiziert, welches für ein CC-NB-ARC-LRR Protein codiert. Bisher gibt es keine Daten über die Wirkung von *Rz2* auf eine Infektion mit BSBMV, weshalb in einem ersten Versuch diese getestet wurde. Hierbei wurden homozygote Züchtungslinien mit cDNA Vollängen Klone von BNYVV und BSBMV inokuliert. Die Ergebnisse eines DAS-ELISA nach 6 Wochen zeigte, dass keine Virusreplikation beider Viren detektiert werden konnte und *Rz2* sowohl gegen BNYVV als auch BSBMV Resistenz vermittelt.

Eine Agrobakterium-vermittelte Ko-Expression der BNYVV/BSBMV Vollängen Klone zusammen mit *Rz2* (unter Kontrolle eines 35S-Promotors) resultierte in Zelltod in den infiltrierten Bereichen in dem Experimentalwirt *Nicotiana benthamiana*. Die 35S-Promotor getriebene Expression aller einzelnen durch BNYVV codierenden Proteine zusammen mit *Rz2* führte nur in der Kombination mit dem auf RNA2 codierten „Triple gene block protein 1“ (TGB1) zu Zelltod. Die Ko-Expression von BSBMV TGB1, welche 72 % Sequenzhomologie auf Aminosäureebene aufzeigt, und *Rz2* führte ebenfalls zu Zelltod wohingehende eine nicht-translatierbare *Rz2* Variante keinen Zelltod induzierte. Die Proteinexpression von *Rz2* sowie den TGB1 Varianten wurde in den infiltrierten Bereichen durch die C-terminale Fusion mit einem HA-tag mittels Western-Blot nachgewiesen. Diese Ergebnisse zeigen, dass das TGB1 von BNYVV und BSBMV das korrespondierende Avirulenzgen zu dem Resistenzgen *Rz2* darstellt und eine Hypersensitive Reaktion auslöst.

Literatur

CAPISTRANO-GOSSMANN, G. G.; RIES, D.; HOLTGRAWE, D.; MINOCHE, A.; KRAFT, T.; et al.: Crop wild relative populations of *Beta vulgaris* allow direct mapping of agronomically important genes. Nat. Commun. 2017, 8, 15708.

15-4 - Elucidating the mode of action of modular dirigent-jacalin proteins

Lara Esch, Jana Czichowlas, Björn Sabelleck, Ralph Panstruga, Ullrich Schaffrath

Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen, Biologie III (Pflanzenphysiologie)

Plants of the Poaceae family express unique modular proteins with a dirigent and a jacalin-related lectin (JRL) domain. We have shown that overexpression of a member of these proteins (OsJAC1) in rice confers broad-spectrum disease resistance to bacterial and fungal plant pathogens. Using a single cell assay for transient transformation in barley, it was ascertained that both domains are required for pathogen resistance. Consistently, FRET analysis indicated that the domains physically interact with each other when expressed as separate proteins. Attempting to elucidate the mode of action of OsJAC1, we performed a yeast-2-hybrid screen with OsJAC1 as bait and a protein library derived from powdery mildew infected barley leaves as prey. Results revealed candidates from barley and powdery mildew as potentially interacting with OsJAC1. Dicot plants, such as Arabidopsis, do not contain modular proteins with a dirigent and JRL domain. Following the Rosetta-stone-hypothesis, we predicted the existence of protein pairs in Arabidopsis with JLR and dirigent domain that interact with each other to promote resistance against pathogens. We challenged this hypothesis and identified two pairs of candidate genes which will be further evaluated.

15-5 - Der pflanzliche Immunrezeptor LORE – ein potentielles Werkzeug zur Erzeugung bakterienresistenter Kulturpflanzen?

Stefanie Ranf

Technische Universität München, Phytopathologie, Emil-Ramann-Str. 2, 85354 Freising-Weihenstephan

Angeborene Immunität, vermittelt durch die Erkennung sog. Mikroben-assoziiierter Molekülmuster durch spezifische Immunrezeptoren des Wirts, ist essentiell für die Gesundheit von Tieren und Pflanzen. Zellwandbestandteile wie Lipopolysaccharid (LPS), die Hauptkomponente Gram-negativer Bakterienzellwände, sind in direktem Kontakt mit potentiellen Wirten und prädestiniert als Molekülmuster. LPS, besonders der endotoxine Lipid A-Teil, ist einer der stärksten Immunstimulatoren in Säugetieren. LPS löst auch Abwehrreaktionen in Pflanzen aus, die pflanzlichen LPS-Immunrezeptoren konnten jedoch bisher nicht identifiziert werden.

Wir zeigen, dass LPS von verschiedenen *Pseudomonas*- und *Xanthomonas*-Spezies bereits in geringen Mengen typische Abwehrreaktionen in *Arabidopsis thaliana* auslösen. Um die pflanzlichen Mechanismen der LPS-Immunerkenkung aufzuklären, haben wir in einem genetischen Screen LPS-insensitive Mutanten isoliert. Diese sog. *lore* (LipoOligosaccharide-specific Reduced Elicitation)-Mutanten zeigen keine Abwehrreaktionen nach LPS-Elizitierung und sind dementsprechend hypersuszeptibel gegenüber *Pseudomonas*-Infektionen. Mittels genetischer Kartierung konnte LORE den Lektin-Rezeptorkinasen zugeordnet werden. Transiente Expression von LORE in ansonsten LPS-insensitiven Tabakpflanzen führt dabei zu typischen LPS-induzierten Abwehrreaktionen und beweist die Funktion von LORE als LPS-Immunrezeptor. LORE ist hauptsächlich in Blättern, besonders in den Schließzellen, exprimiert und trägt zur präinvasiven Immunität gegen eindringende Bakterien bei. Durch genetische Modulation der Rezeptoraktivität kann diese Funktion signifikant verstärkt und damit die präinvasive Resistenz deutlich erhöht werden. Ein Interspeziestransfer von LORE oder modifizierten LORE-Varianten in verwandte Kulturpflanzen wie Tomate und Kartoffel ist somit ein mögliches Werkzeug zur Herstellung bakterienresistenter Kulturpflanzen.

Literatur

Ranf, S., N. Gisch, M. Schäffer, T. Illig, L. Westphal, Y.A. Knirel, P.M. Sánchez-Carballo, U. Zähringer, R. Hückelhoven, J. Lee, and D. Scheel, 2015: A lectin S-domain receptor kinase mediates lipopolysaccharide sensing in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Immunology* **16** (4), 426-433.

15-6 - Scopoletin für den Pflanzenschutz

Plant secondary metabolite controls crop disease

Sebastian Beyer, Alexander Beesley, Philipp Rohmann, Holger Schultheiss, Uwe Conrath, Caspar Langenbach

Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen, Institut für Pflanzenphysiologie

Der pflanzliche Sekundärstoff Scopoletin ist für eine Anwendung im angewandten Pflanzenschutz vielversprechend. Es ist zwar bekannt, dass Scopoletin zur pflanzlichen Stresstoleranz beiträgt. Es wurde aber bislang nicht untersucht, ob das natürliche Cumarin für den Pflanzenschutz nutzbar ist. Unsere Analysen zeigen, dass Scopoletin bei der Nichtwirt-Interaktion von *Arabidopsis thaliana* mit dem Pilz *P. pachyrhizi* (Erreger des asiatischen Sojabohnenrosts [SBR]) in inokulierten Blättern akkumuliert. In Blättern der Sojabohne unterbleibt die Scopoletin-Akkumulation jedoch selbst nach einem biotischen oder abiotischen Stressereignis. Eine Sprühapplikation von Sojabohnen-Blättern mit

Scopoletin reduziert die Ausprägung von SBR-Symptomen. Weitere Analysen zeigten, dass die Schutzwirkung von Scopoletin nicht auf eine Induktion endogener pflanzlicher Stressantworten, sondern vielmehr auf eine den Pilz hemmende Wirkung zurückzuführen ist. Einhergehend mit der Schlüsselfunktion bei der Scopoletin-Biosynthese, bewirkte die konstitutive Expression der Feruloyl-CoA 6'-hydroxylase 1 (*AtF6'H1*) aus *Arabidopsis* die Synthese von Scopoletin in pflanzlichen Zellkulturen. Darüber hinaus bewirkte die mit der *AtF6'H1*-Überexpression hervorgerufene Anreicherung von Scopoletin und dessen Glykosid Scopolin eine verringerte Anfälligkeit der Sojabohne für verschiedene Schadpilze. Unseren Daten zufolge stellen sowohl die Sprühbehandlung von Sojabohnen mit Scopoletin, als auch die gentechnisch hervorgerufene Akkumulation des Cumarins zwei wirksame Strategien zur nachhaltigen Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten dar.

Literatur

- CONRATH U., G. J. M. BECKERS, C. LANGENBACH, M. R. JASKIEWICZ, 2015: Priming for enhanced defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* **14**, 699-708.
- Goellner K., C. Langenbach, U. Conrath, E. Koch and U. Schaffrath, 2010: *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. *Mol. Plant Pathol.* **11**, 169-177.
- LANGENBACH C., R. CAMPE, U. SCHAFFRATH, K. GOELLNER AND U. CONRATH, 2013: UDP glucosyltransferase UGT84A2/BRT1 is required for *Arabidopsis* nonhost resistance to the Asian soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi*. *New Phytologist*. **198**, 536-545.
- Langenbach C., R. Campe, S. B. Beyer, A. N. Müller, U. Conrath, 2016: Fighting Asian Soybean Rust. *Frontiers in Plant Science*. **7**, 797.
- Langenbach C., H. Schultheiss, M. Rosendahl, N. Tresch, U. Conrath and K. Goellner 2015: Interspecies gene transfer provides soybean resistance to a fungal pathogen. *Plant Biotechnology Journal*. **14**, 97-119